

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 4 月 10 日 (10.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/028444 A1

(51) 国際特許分類: A01K 67/027, G01N 33/15, 33/50, A61K 45/00, A61P 3/10

葉区旭ヶ丘一丁目 2 7 番 8 号 Miyagi (JP). 村田 和子 (MURATA, Kazuko) [JP/JP]; 〒981-3212 宮城県 仙台市 泉区長命ヶ丘六丁目 1 3 番 2 2 号 Miyagi (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/07674

(22) 国際出願日: 2002 年 7 月 29 日 (29.07.2002)

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052 東京都 港区 赤坂二丁目 8 番 5 号若林ビル 3 階 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AU, CA, US.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-304645 2001 年 9 月 28 日 (28.09.2001) JP

規則 4.17 に規定する申立て:
— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 菅村 和夫 (SUG-AMURA, Kazuo) [JP/JP]; 〒981-0904 宮城県 仙台市 青

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NONHUMAN MAMMAL MODEL OF AUTOIMMUNE DISEASE HAVING OX40L GENE TRANSFERRED THEREINTO

(54) 発明の名称: O X 4 0 L 遺伝子を導入した自己免疫疾患モデル非ヒト哺乳動物

(57) Abstract: It is intended to provide a transgenic nonhuman mammal model of an autoimmune disease which has an OX40L gene transferred thereinto and application thereof to screening of a remedy for the autoimmune disease. Constructing transgenic mice constantly expressing OX40L which is one of TNF family molecules in T cells, it is found out that these mice suffer from autoimmune diseases and, therefore, are usable as autoimmune disease models. The transgenic nonhuman mammal suffering from the autoimmune disease can be constructed by expressing the OX40L gene under the regulation by a T cell-specific lck promoter. The transgenic nonhuman mammal suffers from an autoimmune disease such as interstitial pneumonia, inflammatory bowel disease, splenomegaly, adenia or hyperimmunoglobulinemia and can be effectively employed in screening a remedy for such an autoimmune disease.

[続葉有]

WO 03/028444 A1



(57) 要約:

OX40L遺伝子を導入した自己免疫疾患モデルトランスジェニック非ヒト哺乳動物、及びその自己免疫疾患治療薬のスクリーニングへの利用方法を提供するものである。TNFファミリー分子の1つであるOX40Lを、T細胞で恒常的に発現するトランスジェニックマウスを作成したところ、これらのマウスが自己免疫疾患を発症し、自己免疫疾患モデルとして有用であることを見い出した。本発明の自己免疫疾患を発症するトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、OX40L遺伝子を、T細胞特異的lckプロモーター制御下で発現させることにより作製することが出来る。本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、間質性肺炎、炎症性腸炎、巨脾症若しくはリンパ腺症、又は高免疫グロブリン血症等の自己免疫疾患を発症し、これらの自己免疫疾患治療薬のスクリーニングに有効に利用することができる。

明 細 書

OX40L 遺伝子を導入した自己免疫疾患モデル非ヒト哺乳動物

5 技術分野

本発明は、自己免疫疾患モデル非ヒト哺乳動物、詳しくはOX40L 遺伝子を導入した自己免疫疾患モデルトランスジェニック非ヒト哺乳動物、及びその自己免疫疾患治療薬のスクリーニングへの利用に関する。

10 背景技術

OX40 (CD134) は、TNF 受容体ファミリーに属する分子で、活性化T細胞に一過性に発現する。一方、OX40L (OX40リガンド) は、活性化B細胞、活性化樹状細胞などのAPC (抗原提示細胞) に発現する。T-APC細胞の相互作用を通じて共刺激を加える場合の
15 TNFファミリーメンバーの影響については、多くの報告がなされており、その因果関係として、自己免疫疾患の原因という点において、それらが果たす役割が重要視されている。これらの報告では、OX40L 遺伝子欠損マウスや限定的に発現するOX40Lトランスジェニックマウスが作製されている。

20 以下に、T-APC相互作用を通じて共刺激を加える場合のTNFファミリーメンバーの影響に関する従来報告について詳述する。

ナイーブT細胞を十分に活性化するには、TCR (T cell receptor) のペプチド/MHC (主要組織適合遺伝子) 複合体との相互作用だけではなく、APC (抗原提示細胞) 上で発現する付随分子による共刺激も
25 必要である。CD80及びCD86という、ともにT細胞上のCD28に結合する周知のアクセサリ分子以外に、OX40L (OX40リガ

ンド)、CD70、4-1BBL及びRRANCEを含む、数種の腫瘍壊死因子(TNF)ファミリーメンバーが、T細胞上の同系のレセプターとの結合の際に共刺激シグナルを誘導することが知られており、また、T細胞上に発現する別のメンバーであるCD40Lも、APC上でレセプターに結合する際のAPCの活性化に不可欠であることが知られている (Grewal and Flavell, 1998, Annu.Rev.Immunol.,16,111)。

こうした観察結果は、T-APC相互作用においてTNF/TNFレセプターファミリーメンバーが共刺激を与える役割を果たしていることを示唆している。

10 当初、その発現がヒトT細胞白血病ウィルスタイプI(HTLV-I)のTaxにより誘導されるヒトgp34と同定されていた分子であるOX40L (Miura et al., 1991, Mol.Cell. Biol., 11,1313)は、B細胞、樹状細胞、及び内皮細胞中で発現し (Ohshima et al., J Immunol. 1997 Oct 15;159(8):3838-48; Kawamata et al., 1998; Murata et al.,2000, J. Exp. Med., 191, 365)、そのレセプターであるOX40は、元来、活性化されたT細胞マーカーであるとされていた (Paterson et al., 1987; Mallet et al., 1990)。T細胞とAPCとの間のOX40L/OX40相互作用が、最適のCD4⁺T細胞反応に大きく係わっていることを示す証拠が次々と現れている。

20 本発明者らは他者と協力してOX40L欠損マウスを作製した。かかるマウスは抗原を与えられた際にAPC機能のかなりの欠損を示し、そうした欠損によりTh1及びTh2サイトカインの双方について、その産生及び増殖におけるT細胞反応が減少していた (Chen et al., 1999, Immunity, 11,689; Pippig et al., 1999, J.Immunol., 163,652; Murata et al.,2000, J.Exp.Med., 191, 365)。同様のAPC機能の欠損は、抗OX40L mAbs (モノクローナル抗体)を用いてインビボでOX40

L/OX40相互作用を妨害することでも誘導される (Murata et al., 2000, J.Exp.Med., 191, 365)。OX40L及びそのレセプターであるOX40を欠損したマウスは、CD4⁺T細胞反応が低下していることも知られている (Kopf et al., Immunity. 1999 Dec;11(6):699-708)。

- 5 Th1及びTh2反応の両方に強い共刺激をもたらす以外に、OX40L/OX40相互作用は、ある種の実験条件下 (Flynn et al., J Exp Med. 1998 Jul 20;188(2):297-304; Oshima et al., 1998; Jember et al., J Exp Med. 2001 Feb 5;193(3):387-92)、抗体反応を変化させる場合 (Chen et al., 1999, Immunity, 11,689; Pippig et al., 1999, J.Immunol., 163,652; 10 Murata et al., 2000, J.Exp.Med., 191, 365; Morimoto et al., J.Immunol. 2000 Apr 15;164(8):4097-104)、及びT細胞の遊走時 (Higgins et al., 1999, J.Immunol.,162, 486; Nohara et al., J.Immunol. 2001 Feb 1;166(3):2108-15)において、Th2に偏った反応を制御することも示されている。

- 15 OX40/OX40Lが用いるのは、記憶T細胞の発生と生存の調節という、直接的かつ重要な手段である (Gramaglia et al., 1998, J. Immunol., 161, 6510 及び 2000, J.Immunol., 165,3043)。脳炎誘発性野生型T細胞をOX40L欠損マウスに養子移入すると、それらのマウスでは病状の持続的進行が不可能になるらしいことが、最近、本発明者らにより示された (Ndhlovu et al., 2001, J.Immunol., 167,2991)。さら 20 に、OX40の刺激が寛容誘導を妨げるとの報告もなされており (Pakala et al., Nat Med. 2001 Aug;7(8):907-12)、これは、OX40L/OX40システムが自己免疫疾患の制御に関与している可能性を示している。確かに、OX40及びOX40Lは、実験的アレルギー性脳炎 25 (EAE)、同種異系の宿主対移植片病 (GVH病: GVHD)、増殖性狼瘡性腎炎及び関節炎など、数種の炎症性障害の組織中に検出される

(Weinberg et al., 1999, J.Immunol., 162, 1818; Tittle et al., 1997, Blood, 89,4652; Stüber et al., 1998, Gastroenterology, 115, 1205; Nakajima et al., J.Immunol. 2001 Feb 1;166(3):2108-15)。

OX40を発現する自己反応性T細胞は、EAE（実験的アレルギー性脳脊髄炎）に罹患したラットから検出され、OX40抗毒素を投与すると、EAEの症状が改善された。加えて、OX40Lのアンタゴニストである可溶性OX40融合蛋白質も、進行中のEAE（Weinberg et al., 1999, J.Immunol.,162, 1818）及びGVHD（Stüber et al., 1998, Gastroenterology, 115, 1205）を抑制するだけでなく、炎症性腸炎（IBD）のモデルマウスにおける進行中の大腸炎（Higgins et al., 1999, J.Immunol.,162, 486）、喘息（Jember et al., J Exp Med. 2001 Feb 5;193(3):387-92）、コラーゲン誘導性関節炎（CIA）（Nakajima et al., J.Immunol. 2001 Feb 1;166(3):2108-15）の症状を改善させるとされている。こうしたデータから、各種自己免疫疾患の免疫制御にOX40L-OX40相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆される。

APC上のOX40Lの発現とは無関係の過剰なOX40Lシグナリングにより、本発明者らは免疫制御に対するOX40Lの影響の重大性をよりくわしく評価する手段を得た。LaneらはCD11cプロモーターのもとでOX40Lトランスジェニック（OX40L-Tg）マウスを作製したが、OX40Lの発現が限定的だったため、T細胞の機能におけるOX40刺激の機能的重要性をはっきり示すことはできなかった。OX40Lの発現は、通常の活性化T細胞上で必ずしもすぐに検出できるわけではない（Murata et al.,2000, J.Exp.Med., 191, 365）。長期間培養された通常ヒトT細胞クローンが、免疫染色で検出されたとおり、OX40Lを発現することが、本発明者らによって最近明らかにされた（Takasawa et al., 2001, Jpn.J.Cancer Res., 92,377）。さらに、OX4

0欠損マウス由来の活性化T細胞が細胞表面上のOX40Lにより検出可能であることも明らかにされており（Kopf et al., Immunity. 1999 Dec;11(6):699-708）、これはT細胞がOX40Lを発現している可能性があることを示している。

- 5 本発明の課題は、自己免疫疾患モデル非ヒト哺乳動物及びその利用、詳しくはOX40L遺伝子を導入した自己免疫疾患モデルトランスジェニック非ヒト哺乳動物、及びその自己免疫疾患治療薬のスクリーニングへの利用方法を提供することにある。

- 10 本発明者は、T-APC細胞の相互作用を通じて共刺激を加える場合のTNFファミリーメンバーの影響についての研究において、TNFファミリー分子の1つであるOX40L（OX40リガンド）を、T細胞で恒常的に発現するトランスジェニックマウスを作成したところ、これらのマウスが自己免疫疾患を発症し、自己免疫疾患モデルとして有用であることを見出し本発明をなした。

- 15 本発明の自己免疫疾患を発症するトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、OX40L遺伝子を、T細胞特異的Ickプロモーター制御下のOX40L cDNAで構成されている発現プラスミドDNAを用いて非ヒト哺乳動物の受精卵に導入することによって作製することが出来る。本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、間質性肺炎、炎症性腸炎、
20 巨脾症若しくはリンパ腺症、又は高免疫グロブリン血症等の自己免疫疾患を発症し、これらの自己免疫疾患治療薬のスクリーニングに有効に利用することができる。

発明の開示

- 25 すなわち本発明は、OX40L遺伝子が導入され、OX40LをT細胞で恒常的に発現していることを特徴とするトランスジェニック非ヒト

- 哺乳動物（請求項 1）や、O X 4 0 L 遺伝子が、G e n B a n k 登録番号 U 1 2 7 6 3 の DNA 配列からなることを特徴とする請求項 1 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物（請求項 2）や、O X 4 0 L 遺伝子が、T 細胞特異的 l c k プロモーター制御下に導入されていることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物（請求項 3）や、O X 4 0 L 遺伝子が導入され、自己免疫疾患を発症していることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物（請求項 4）や、自己免疫疾患が、間質性肺炎であることを特徴とする請求項 4 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物（請求項 5）や、自己免疫疾患が、炎症性腸炎であることを特徴とする請求項 4 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物（請求項 6）や、炎症性腸炎が、腸基底膜における中程度から重度のリンパ系組織の過形成、基底膜における粘膜上皮の過形成、リンパ球の浸潤又は粘膜下リンパ濾胞の増生を発症していることを特徴とする請求項 6 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物（請求項 7）や、自己免疫疾患が、巨脾症又はリンパ腺症であることを特徴とする請求項 4 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物（請求項 8）や、自己免疫疾患が、高免疫グロブリン血症であることを特徴とする請求項 4 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物（請求項 9）や、トランスジェニック非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物（請求項 1 0）からなる。

- また本発明は、O X 4 0 L をコードする発現プラスミド DNA を、非ヒト哺乳動物の受精卵の前核にインジェクションすることにより、O X 4 0 L 遺伝子を非ヒト哺乳動物に導入することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法（請求項 1 1）や、O X 4 0 L 遺伝子が、G e n B a n k 登録番号 U 1 2 7 6 3 の DNA 配列からなるこ

とを特徴とする請求項 1 1 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法（請求項 1 2）や、OX40Lをコードする発現プラスミドDNAが、T細胞特異的 l c k プロモーター制御下のOX40L c DNAで構成されていることを特徴とする請求項 1 1 又は 1 2 記載のトランス

5 ジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法（請求項 1 3）や、OX40L遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を、戻し交配により純化したことを特徴とする請求項 1 1 ～ 1 3 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法（請求項 1 4）や、戻し交配を、

10 少なくとも 1 2 世代行うことを特徴とする請求項 1 4 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法（請求項 1 5）や、非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法（請求項 1 6）や、OX40L遺伝子を l c k プロモーターの下流に組み込んだOX40L発現ベクターを、マウスの受精卵に導入し、該マウスをC57BL/6系

15 マウスに戻し交配したことを特徴とする請求項 1 6 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法（請求項 1 7）からなる。

さらに、本発明は、請求項 1 ～ 9 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を用いることを特徴とする自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法（請求項 1 8）や、自己免疫疾患が、間質性肺炎、炎症

20 性腸炎、巨脾症若しくはリンパ腺症、又は高免疫グロブリン血症であることを特徴とする請求項 1 8 記載の自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法（請求項 1 9）や、請求項 1 ～ 9 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に被検物質を投与し、自己免疫疾患の病徴の変化を評価・測定することを特徴とする請求項 1 7 又は 1 8 記載の自己免疫

25 疾患治療薬のスクリーニング方法（請求項 2 0）や、トランスジェニック非ヒト哺乳動物がマウスであることを特徴とする請求項 1 8 ～ 2 0 の

いずれか記載の自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法(請求項 2 1)や、請求項 1 8 ~ 2 1 のいずれか記載の自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法により得られた糖尿病治療薬(請求項 2 2)からなる。

5 図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明の O X 4 0 L トランスジェニックマウスにおける O X 4 0 L の構築物とその発現を示す図である。

10 A. マウス O X 4 0 L の発現ベクターの構築物は、T 細胞特異的 l c k プロモーターによって制御されるマウス O X 4 0 L の c D N A として構成されている。

B. 作製した 3 匹の独立した初代マウス又は野生型マウスの胸腺又は脾臓における O X 4 0 L の発現をフローサイトメトリック分析により調べた結果を示す図である。小さい点線は野生型マウス由来のものを、太線は O X 4 0 L - T g 1 マウス由来のものを、細線は O X 4 0 L - T g 2
15 マウス由来のものを、大きい点線は O X 4 0 L - T g 3 マウス由来のものをそれぞれ示す。

第 2 図は、本発明の O X 4 0 L トランスジェニックマウスの表現型を示す図である。

20 A. 野生型マウス (□) 及び O X 4 0 L T g マウス (■) の脾臓における全細胞数、C D 4 + T 細胞数及び C D 8 + T 細胞数をそれぞれ示す。

B. 脾臓の C D 4 + T 細胞における C D 2 5 又は C D 6 9 の発現を示す。

第 3 図は、本発明の O X 4 0 L トランスジェニックマウスにおける記憶 T 細胞群及び細胞質サイトカインを示す図である。

25 A 及び B. 記憶 T 細胞には、C D 4 4 の発現増大並びに C D 6 2 L 及び C D 4 5 R B の発現減少という特徴があった。

C. ナイーブ (C D 6 2 L ^{h i g h} C D 4 4 ^{l o w}) C D 4 + T 細胞及び記憶

(CD62L^{low}CD44^{high}) CD4⁺T細胞をPMA及びイオノマイシンで刺激し、その後、染色により、細胞質IL-2、IFN γ 及びIL-4を検出した。

第4図は、本発明のOX40Lトランスジェニックマウスにおける増殖T細胞の活性化を示す図である。

A. 抗CD3抗体、コンカナバリンA (ConA)、及びイオノマイシンを添加したホルボールミリステートアセテート (PMA) に対する野生型マウス由来の脾臓T細胞 (□) 及びOX40Lトランスジェニックマウス (■) の増殖反応を調べた結果を示す。

10 B. 抗CD3抗体を用いて刺激したT細胞のサイトカイン産生量を調べた結果を示す。

C. 野生型マウス (□) 又はOX40Lトランスジェニックマウス (■) の脾臓T細胞を抗原 (KLH) 特異的リコール増殖結果を示す。

D. KLHでT細胞を刺激した際のサイトカイン産生能を示す。

15 E. SEA及び/又はLPSを注入したマウスを用いて、インビボにおいてT細胞が生存できるか否かを調べた結果を示す。SEAを野生型 (○) 及びOX40Lトランスジェニックマウス (●) に注入し、LPSとSEAを野生型マウス (□) 及びOX40Lトランスジェニックマウス (■) に注入した。

20 第5図は、本発明のOX40LトランスジェニックマウスにおけるポリクローナルなB細胞活性化を示す図である。

A. 図中の「○」は野生型マウスにおける血清イムノグロブリンアイソタイプの濃度を、「●」はOX40Lトランスジェニックマウスにおける血清免疫イムノグロブリンアイソタイプの濃度をそれぞれ示す。

25 B. 図中の「○」は野生型マウスにおけるssDNA又はdsDNAに対する血清抗DNA抗体のレベルを、「●」はOX40Lトランスジェ

ニックマウスにおける s s DNA 又は d s DNA に対する血清抗 DNA 抗体のレベルをそれぞれ示す。

- C. 図中の「○」は野生型マウスにおける血清 IL-5 又は IL-13 のレベルを、「●」は OX40L トランスジェニックマウスにおける血清 IL-5 又は IL-13 のレベルを示す図である。

第6図は、本発明の OX40L トランスジェニックマウス及び野生型マウスの肺、大腸、及びリンパ節をヘマトキシリン及びエオシンで染色した結果 (A)、及び本発明の OX40L トランスジェニックマウスの肺及び大腸における CD4⁺細胞又は CD8⁺細胞を蛍光顕微鏡により視覚化した結果 (B) を示す写真である。

A. 写真上は肺の切片を 200 倍に、写真中は大腸の切片を 100 倍に、写真下はリンパ腺の切片を 1000 倍にそれぞれ拡大したものである。

B. 写真上は肺を 400 倍に、写真下は大腸を 200 倍にそれぞれ拡大したものである。

- 第7図は、本発明の OX40L トランスジェニックマウス由来の CD4⁺T細胞又は CD8⁺T細胞を移入した r a g - 2 欠損マウスにおける肺切片及び大腸切片をヘマトキシリン及びエオシンで染色した結果 (A)、及び本発明の OX40L トランスジェニックマウスをラット免疫グロブリン又は MGP34 モノクローナル抗体で処理した後、かかるマウス由来の CD4⁺T細胞を移入した r a g - 2 欠損マウスにおける肺切片及び大腸切片をヘマトキシリン及びエオシンで染色した結果 (B) を示す写真である。

A. 写真中の肺切片は 200 倍に、大腸切片は 100 倍にそれぞれ拡大したものである。

- B. 写真中の肺切片は 200 倍に、大腸切片は 100 倍にそれぞれ拡大したものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明において、OX40L（OX40リガンド）を、T細胞で恒常的に発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物を作製するためには、
5 適宜の非ヒト哺乳動物を用いることができるが、自己免疫疾患治療薬のスクリーニング等に有効に利用するためには、マウスを用いるのが好ましい。トランスジェニック非ヒト哺乳動物を作製するためのマウスとしては、種々のものが利用できるが、例えばC57BL/6、DBA/2などが挙げられる。OX40L cDNAで構成された発現ベクターを、
10 例えば、(C57BL/6 × DBA/2) F1 受精卵に導入することにより、トランスジェニックマウスを作製することができる。OX40L遺伝子が導入されたトランスジェニックマウスは、遺伝子が導入されていることが確認されたF1マウスを親のマウスと戻し交配し、導入された遺伝子の純化を図る。本発明においては、例えば親のマウスのC57BL/6を背景に少なくとも1-2世代の戻し交配が行われる。

本発明で用いるOX40L遺伝子は、公知のものであり、例えば、GenBank登録番号U12763として登録されている。OX40L遺伝子の導入に用いる発現ベクターとしては、公知の発現ベクターを用いることができる。発現ベクターに用いるプロモーターとしては、OX
20 40LをT細胞において恒常的に発現する機能を有するベクターであれば、適宜のプロモーターを用いることができるが、好適なプロモーターとして、T細胞特異的Ickプロモーターを例示することができる。

本発明のOX40L遺伝子を導入した自己免疫疾患モデルトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、自己免疫疾患治療薬のスクリーニングに
25 利用することができる。

かかるスクリーニング方法としては、例えば、自己免疫疾患を発生し

たモデルマウスに被検物質を投与し、該モデルマウスにおける自己免疫疾患の病徴を評価・測定することにより行うことができる。自己免疫疾患の病徴を評価・測定する方法としては、被検物質を投与されたマウスから病理組織を採取し、該組織像を解析・評価する方法を例示することができる。又、自己免疫疾患の病徴の発生及び／又は進行の程度を測定・評価するに際しては、自己免疫疾患発生のモデルマウスと同種の野生型マウスを同時に用いることが、個体レベルで正確な比較実験をすることができることから好ましい。

本発明のスクリーニング方法により得られる自己免疫疾患の治療剤は、自己免疫疾患として発症する、間質性肺炎、炎症性腸炎、巨脾症若しくはリンパ腺症、又は高免疫グロブリン血症等の治療に有効に適用することができる。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

15 実施例 1 (OX40Lトランスジェニックマウスの作製)

OX40Lトランスジェニック (OX40L-Tg) マウスを、マウスOX40リガンドをコードする発現プラスミドDNAの前核注入により作製した。かかるマウスOX40L発現ベクターの構築物は、T細胞特異的lckプロモーターの制御下にマウスOX40L cDNAが構成されていた(図1A)。OX40L発現プラスミドDNAを注入したF1受精卵(C57BL/6×DBA/2)を用いて3匹の初代マウスを作製し、それらをC57BL/6マウスと交配した。フローサイトメトリ分析により、3匹のOX40L-Tg系統マウス由来の胸腺細胞群にはOX40Lの発現が同様に見られたが、野生型マウス由来のものではかかる発現が見られないことがわかった(図1B)。3匹のOX40L-Tg系統マウスのうち2匹のOX40L-Tg (OX40L-Tg1

及びOX40L-Tg2) マウスでは、脾臓細胞においてかなりのOX40Lを発現していたが、残りの1匹のマウス(OX40L-Tg3)においては、OX40Lの弱い発現が見られるにとどまっていた(図1B)。そこで、これら3系統のトランスジェニックマウスを、C57BL/6系統マウスと少なくとも12回戻し交配した。

実施例2 (OX40LトランスジェニックマウスにおけるT細胞の自発的活性化)

まず、OX40L導入遺伝子が結果として、胸腺、脾臓、及びリンパ節におけるリンパ球細胞群のすべてにおいて、なんらかの内因性変化をもたらすかどうかをフローサイトメトリーを用いて調べてみた。CD4⁺及びCD8⁺発現により調査した、胸腺T細胞数及び部分母群については、3匹のOX40L-Tg系統は見たところ異常を示さなかった。しかし、脾臓及びリンパ節における全リンパ球の数は、OX40L-Tg1マウス及びOX40L-Tg2マウスにおいてのみ、かなりの増加が示された。特にCD4⁺T細胞は二倍に増加したが、CD8⁺T細胞では、これら2匹のOX40L-Tg系統においても検出されなかった(図2A)。OX40L-Tg3の脾臓あるいはリンパ節におけるリンパ球の数的変化は、ごくわずかに認められたに過ぎなかった。OX40L-Tg1マウスにおけるCD4⁺T細胞群の増加を考慮して、次にマウスが活性化表現型を持つT細胞を保持しているかどうかを調べた。活性化T細胞マーカーであるCD25やCD69を発現する細胞群は、野生型マウスとは対照的にOX40L-Tg1マウス由来の脾臓CD4⁺T細胞においてはかなり増加していた(図2B)。OX40L-Tg2マウスを用いた場合でも、同様の結果が得られた。これらのことから、OX40L-Tgマウスでは多くのCD4⁺T細胞が自発的に活性化されていることがわかった。B細胞群では、脾臓におけるIgM⁺又はB220⁺B細胞

数が、導入遺伝子OX40Lによって増加することはほとんどなかった。

OX40L/OX40システムは記憶T細胞の生存及び維持に関与しているとの報告があるため (Gramaglia et al., 1998, J. Immunol., 161, 6510 及び 2000, J. Immunol., 165, 3043)、OX40L-Tg1マウス中の記憶T細胞群を評価し、野生型マウス及びOX40L欠損マウス (Murata et al., 2000, J. Exp. Med., 191, 365) の場合と比較した。その結果、OX40L-Tgマウス由来の記憶T細胞では、CD44の発現が増加し、CD62L及びCD45RBの発現が減少していた。CD62L^{low}CD44^{high}及びCD45RB^{low}の記憶T細胞の割合 (%) 及び数は、野生型マウスと比較して、OX40L-Tg1マウスの脾臓CD4⁺T細胞でかなり増加していたが、OX40L欠損マウスでは減少していることがわかった (図3A及びB)。野生型マウスに認められた年齢依存的なT細胞の増加は、OX40L-Tg1マウスでは見られなかった。記憶T細胞の数的増加は、これらのマウスにおいて早くも4週齢で認められ、この持続的な増加は年齢依存的なものではないことが示された (図3A)。これらのことから、OX40L-Tgマウスにおける記憶細胞の出現促進が明らかになった。次に、抗原投与後のこれらマウスにおけるサイトカイン産生量を測定してみた。その結果、ナイーブT細胞及び記憶T細胞の機能解析を行った。OX40L-Tg1マウス又は野生型マウス由来のナイーブ (CD62L^{high}CD44^{low}) CD4⁺T細胞若しくは (CD62L^{low}CD44^{high}) CD4⁺T細胞を、PMA及びイオノマイシンで刺激した。その後、免疫染色により、細胞質IL-2、IFN γ 及びIL-4を検出した。OX40L-Tg1マウス由来のものは、IL-2陽性細胞群、IFN γ 陽性細胞群及びIL-4陽性細胞群のすべてに関して、記憶T細胞及びナイーブT細胞の両方で、野生型マウス由来のものよりも大きな増加を示しており (図3C)、

これは、OX40陽性CD4⁺T細胞が、インビボでも表現型を活性化
する傾向にあることを示している。脾臓T細胞のV β を使用してさらに
解析することで、かかる記憶T細胞の増加を確認した。これらの結果に
より、OX40L-Tgの末梢T細胞の大半が活性化状態及び記憶状態
5 にあることがわかった。

実施例3 (OX40LトランスジェニックマウスにおけるT細胞活性化
の増大)

OX40Lトランスジェニックマウスにおける記憶T細胞の機能的能
力を調べるため、T細胞の、各種刺激に反応した増殖能力及びサイトカ
10 イン産生能を測定するいくつかの実験を行った。まず、免疫していない
野生型マウス及びOX40L-Tg1マウス由来の脾臓T細胞に関して、
抗CD3抗体、コンカナバリンA (ConA)、又はイオノマイシンを加
えたホルボールミリステートアセテート (PMA) による増殖反応につ
いて調べてみた。これらの刺激のすべてに対して、OX40L-Tg1
15 のT細胞は、野生型T細胞よりもかなり高い増殖性反応を示した (図4
A)。抗CD3抗体で刺激されたT細胞のサイトカイン産生能も、免疫染
色で確認することができた。IL-2、IFN γ 、IL-4、IL-5
及びIL-10をそれぞれ産生するT細胞群は、野生型マウスよりOX
40Lトランスジェニックマウスにおいてかなり増加していることが示
20 された (図4B)。

次に、OX40L-Tg1マウス及び野生型マウス由来のT細胞につ
いて、抗原特異的リコール増殖アッセイを行った。上記T細胞はどちら
もインビボにおいて、完全フロイントアジュバントによるスカシガイヘ
モシアニン (KLH) で処理した。OX40L-Tg1マウスのT細胞
25 は、野生型マウスよりもかなり大きな増殖反応を示した (図4C)。OX
40L-Tg1マウスのT細胞からのIL-2、IFN γ 、IL-4、

I L - 5 及び I L - 1 0 等のすべてのサイトカイン産生も、野生型マウスと比較してかなり増大していることがわかった(図 4 D)。これらの結果は、M O G 刺激による、本発明者らの以前の報告(Ndhlovu et al., 2001, J.Immunol., 167, 2991) と一致するものであり、O X 4 0 L - T g マウスの T 細胞が野生型マウスのものよりも効率的に抗原と反応することを示している。O X 4 0 L - T g マウスにおける記憶 T 細胞の増加についてさらに調べるため、O X 4 0 L - T g 1 マウス及び野生型マウスの T 細胞について、インビボでの生存能を比較した。T 細胞のインビボでの生存能を、V β 3 を発現する T 細胞を活性化する S E A と細胞死誘導活性阻害物質として知られる L P S とを接種したマウスを用いて分析した(Maxwell et al., 2000, J.Immunol., 164, 107)。V β 3 を発現する C D 4 + T 細胞の減少は、野生型と比較して O X 4 0 L - T g 1 マウスではかなり少なく(図 4 E)、これは、T 細胞上の O X 4 0 L の発現が、インビボにおける T 細胞死誘導活性の抑制に関わっていることを示している。

実施例 4 (O X 4 0 L トランスジェニックマウスにおけるポリクローナル B 細胞活性化)

O X 4 0 L トランスジェニックマウスにおいて B 細胞数の増加は認められなかったが、B 細胞がインビボにおいて活性化されているかどうかを調べるために、血清免疫グロブリンアイソタイプの濃度を測定した。O X 4 0 L - T g 1 マウスは野生型マウスと比較して I g G 1 は 1 0 倍、I g E は 2 2 倍、I g A は 2 5 倍というレベルの上昇を示したが、その一方、I g M、I g G 2 a、及び I g G 2 b の増加は少なく、それぞれ O X 4 0 L - T g 1 マウスの血清中で 3 倍、4 倍、4 倍であった。また、I g G 3 のレベルについては、野生型マウスよりも O X 4 0 L - T g 1 マウスの血清のほうが高いということではなかった(図 5 A)。O X 4 0 L - T g 1 マウスに見られるこのような偏った I g アイソタイプの産生は、

上述したようにそのT細胞のサイトカイン分泌レベルの上昇により説明
ができる。また、s s DNA及びd s DNAに対する血清抗DNA抗体
レベルがかなり増大したことが、OX40L-Tg1マウスの血清にお
いて確認された(図5C)。以上の結果から、OX40L-Tg1マウス
5 がB細胞のポリクローナル抗体を活性化し、自己免疫の産生につな
がったことがわかる。さらに、マウスにおける各種サイトカインの血清レ
ベルを分析した。IL-5とIL-13のレベルは、OX40L-Tg1
マウスの血清では、野生型マウスと比較してかなり上昇していたが、I
L-2、IL-4、IL-10、及びIFN γ などその他のサイトカイ
10 ンは、OX40Lトランスジェニックマウスと野生型マウスのどちらに
おいても検出できなかった(図5B)。IL-5は、本発明者らが観察し
たOX40Lトランスジェニックマウスにおける血清IgAレベルの上
昇に関与し、その原因となっていると思われる。

実施例5 (OX40Lトランスジェニックマウスにおける自己免疫炎症
15 性疾患の発生)

組織学的測定により、OX40Lトランスジェニックマウスの各器官
に自己免疫的徴候が現れていることがわかった。月齢9ヶ月のOX40
L-Tg1マウスの肺において、気管支及び血管周縁部にはリンパ球の
著しい浸潤が、肺胞には多数の好酸性泡沫細胞を含んだコレステリン様
20 結晶が認められ、重度の間質性肺炎を起こしていた(図6A)。間質性肺
炎は、生後3ヶ月という早い時期にOX40L-Tg1マウスとOX4
0L-Tg2マウスの双方で認められ(表1)、間質性肺炎の発生が年齢
依存的である可能性を示唆された。

(表 1)

a) OX40Lトランスジェニックマウスにおける自己免疫疾患の発生				
月 齢	マウス	マウス数	自己免疫疾患のマウス数 ^a	
			間質性肺炎	炎症性腸炎
6-7週	野生型	4	0 ^b	0 ^b
	T _g	9	4(44%)	3(33%)
3ヶ月未満	野生型	10	0	0
	T _g	13	13(100%)	13(100%)
b) T細胞の移入による自己免疫疾患の誘導				
接種済細胞	マウス	マウス数	自己免疫疾患のマウス数 ^a	
			間質性肺炎	炎症性腸炎
CD4 ⁺ T細胞	野生型	6	0 ^b	0 ^b
	T _g	11	11(100%)	11(100%)
CD8 ⁺ T細胞	野生型	6	0	0
	T _g	3	0	0

<a:組織病理的に明らかな自己免疫疾患を持つマウス数 b:発生率 >

- 5 腸組織の分析により、OX40Lトランスジェニックマウスの炎症性腸炎が明らかになった。月齢9ヶ月のOX40L-T_g1マウスにおいて、腸基底膜における中～重度のリンパ組織の過形成、基底膜における粘膜上皮の過形成、リンパ球の浸潤及び粘膜下リンパ濾胞の増殖が認められた(図6A)。こうした炎症性腸炎は、生後わずか3ヶ月でOX40L-T_g1マウスとOX40L-T_g2マウスの双方で観察された(表1)。

- 15 巨脾症及びリンパ腺症がOX40Lトランスジェニックマウスに認められた。そのリンパ節では形質細胞の増加とラッセル小体の形成が見られた。ラッセル小体は形質細胞における好酸性細胞内沈着物、及び抗体の産生異常を反映しており、よく高免疫グロブリン血症を併発する(図6A)。心臓、腎臓、肝臓などのOX40Lトランスジェニックマウスのその他の組織は、組織学的に正常であり、尿中にはブドウ糖及び蛋白質が存在せず、腎臓あるいは脾臓の機能不全を示す証拠は見られなかった。

実施例 6 (OX40L トランスジェニックマウスの CD4⁺T 細胞の導入による、RAG-2 欠損マウスにおける自己免疫疾患の誘導)

OX40L-Tg マウスの間質性肺炎が感染性物質によるものではないことを確認するため、かかるマウスの SPF 状況を確認する多くの実験を行った。マウスの肺炎や腸炎が伝染性の微生物によってもたらされたという証拠は発見できなかった。OX40L-Tg マウスにおいて病原性自己反応性 T 細胞が発生しているかどうかを調べるため、T 細胞及び B 細胞を欠損した C57BL/6 RAG-2 欠損マウスに Tg マウス由来の CD4⁺T 細胞及び CD8⁺T 細胞の移入を行った。RAG-2 欠損マウスは、CD4⁺T 細胞においては、接種の三週間後にまず体重減少及び下痢様症状を示したが、CD8⁺T 細胞においては何も示されなかった (表 1)。CD4⁺T 細胞移入の 2 週間後から 4 週間後の組織学的分析で、重度のリンパ球性間質性肺炎及び大腸の炎症性腸炎が認められた (図 7 A)。野生型マウス由来の CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞のどちらを接種した場合でも、RAG-2 欠損マウスにおいては自己免疫は発生していなかった。これらの結果により、OX40L トランスジェニックマウス由来の CD4⁺T 細胞は、RAG-2 欠損マウスにおける自己免疫疾患の誘導に関する重要なエフェクター細胞であることがわかる。かかる細胞を移入された RAG-2 欠損マウスの CD4⁺T 細胞は、OX40L-Tg マウスの CD4⁺T 細胞と同様に高レベルの IL-5 及び IL-13 を分泌していた。マウス OX40L に対して特異的に阻害するモノクローナル抗体である MGP34 の投与、及び OX40L-Tg マウスから RAG-2 欠損マウスへの CD4⁺T 細胞移入により、肺及び大腸での自己免疫疾患の誘導が阻害された (図 7 B)。これらの結果から、リンパ球性間質性肺炎及び大腸の炎症性腸炎の発生には、T 細胞における OX40/OX40L 相互作用が必要とされることがわかつ

た。

(評価)

数種のTNFファミリーメンバー間での発現の変化によりリンパ球の反応が変化することは立証されている。Fas又はそのリガンドである Fas リガンドが存在していない場合には重篤な自己免疫疾患が発生する (Watanabe-Fukunaga et al., 1992, Nature, 356,314; Takahashi et al., 1994, Cell, 76,969)。また、CD30リガンドは自己免疫性糖尿病を予防する働きがあると考えられている。逆に、BAFF又はCD40リガンドの発現増加はそれぞれ、顕著な自己免疫や炎症の発生につながる (Mackaw et al., 1999, J.Exp.Med., 190,1697; Mehling et al., 2001, J.Exp.Med., 194,615)。本実施例により示された結果から、OX40の刺激が自己免疫抗体を分泌させ、肺及び大腸に炎症性の浸潤を発生させることが、OX40/OX40L相互作用によって明らかになった。

本発明者らは、当初OX40L (ヒトgp34) がヒトT細胞白血病ウィルスタイプI (HTLV-I) のTax遺伝子により誘導される分子として同定しているが (Miura et al., 1991, Mol.Cell. Biol., 11,1313)、培養された正常ヒトT細胞クローンがOX40Lを発現することから、同様にOX40シグナリングに関与する、T細胞上で過剰発現しているOX40Lの免疫的因果関係の調査に着手した。本発明者らは、OX40Lトランスジェニックマウスの脾臓T細胞及びリンパ節T細胞が高レベルでCD69及びCD25を発現し、60%を超えるCD4⁺T細胞がCD62L^{low}、CD44^{high}及びCD45RB^{low}であることを見出した。このことから、これらのT細胞群が活性化記憶表現型であることを示唆される。これらT細胞をさらに分析した結果、興味深いことに、T細胞の記憶表現型への転換が年齢依存性ではないことを見出し、また、OX40L-Tgマウス由来の記憶T細胞が、野生型マウスの場合

合と比較すると、刺激後リコールサイトカイン反応の増大とともに抗原依存型反応を増強させることがわかった。こうした初期の知見は、エフェクター記憶T細胞反応（EAEその他）の持続によるOX40/OX40Lの役割を明確にする上での以前の疑問点と一致するものであった。

- 5 また、スーパー抗原に刺激された末梢T細胞の長い生存期間は、OX40L-Tgマウスにおいてさらに長くなることがわかった（図4E）。OX40による刺激は、SEAとLPSによる刺激の後で初期増加と持続性の増強を引き起こす（Maxwell et al., 2000. J.Immunol., 164,107）。一次的なポリクローナル拡張の調節により、OX40の自発的な刺激が
- 10 T細胞の記憶の抗原依存的形成を増強することが明らかになった。本実施例による結果から、OX40/OX40Lシグナリングが記憶T細胞群のインビボでの保全と生存に関与していることが明らかになった。

- OX40は、リウマチ性関節炎、GVHD、ループス腎炎などの自己免疫疾患患者及び多発性硬化症やEAEのモデルマウスの自己反応性T
- 15 細胞に発現すると報告されている（Weinberg et al., 1999, J.Immunol.,162, 1818; Tittle et al., 1997, Blood, 89,4652; Stüber et al., 1998, Gastroenterology, 115, 1205; Higgins et al., 1999, J.Immunol.,162, 486）。加えて、OX40/OX40Lシグナリングを消滅させる可溶性OX40融合蛋白質（OX40Lのアンタゴニスト）
- 20 は、進行中のEAE（Weinberg et al., 1999, J.Immunol.,162, 1818;Ndhlovu et al., 2001, J.Immunol.,167, 2991）、半同種異系の宿主対移植片病（GVHD）（Stüber et al., 1998, Gastroenterology, 115, 1205）を抑制し、炎症性腸炎モデルマウスにおいて進行中の大腸炎（IBD）（Higgins et al., 1999, J.Immunol.,162, 486）を改善することが
- 25 記されている。上記結果から、各種自己免疫疾患の免疫調節にOX40/OX40L相互作用が非常に重要な役割を果たしていることが考えら

れる。かかるトランスジェニックマウスの組織学的測定において予想外の発見だったのは、肺及び大腸において炎症性疾患の発生であった。Tgマウスの肺の間質性組織及び腸基底膜において、CD4⁺T細胞については著しい浸潤が観察されたが、CD8⁺T細胞については観察されなかった(図6B)。これらマウスの自己免疫疾患の発生原因因子について調査した。OX40L-TgマウスからRAG-2欠損マウスへのCD4⁺T細胞の再構築によって間質性肺炎及び炎症性腸炎が発生しており、これはCD4⁺T細胞が重要なエフェクター細胞であることを示している。OX40L-TgマウスからRAG-2欠損マウスへのCD4⁺T細胞移入に伴い、マウスOX40Lに対して特異的に阻害するモノクローナル抗体MGP34を投与し、以前肺に認められた組織学的変化を予防した(図7B)。OX40L-Tgマウスにおける間質性肺炎の症状は、ヒトのリンパ性間質性肺炎(LIP)の組織学的特徴と同様である。

興味深いことに、肺の異常は、ヒトT細胞白血病ウィルスタイプ1(HTLV-1)関連ミエロパシー(HAM/TSP)やHTLV-1関連ぶどう膜炎の患者や、HTLV-1患者において認められた(Sugimoto et al., 1987, Lancet, 2,1220; Maruyama et al., 1989, Medical Immunol.,18,763; Setoguchi et al., 1991, Am. Rev.Res.Dis. 144, 1361; Sugimoto et al., 1997, 日本胸部臨床, 35,184; Sugisaki et al.,1998, Am. J. Trop. Med. Hyg, 58,721)。OX40Lの発現に関しては、当初HTLV-1感染ヒトT細胞株に関するものが記載され(Tanaka et al., 1985,Int.J.Cancer,36,549; Miura et al., 1991, Mol.Cell.Biol.11,1313)、最近、EBウイルス感染B細胞株に特異的な細胞傷害性Tリンパ球クローンに関するものが発見されている(Takasawa et al., 2001, Jpn.J.Cancer Res., 92,377)。OX40Lの発現は、OX40/OX40Lにおける役割をT細胞間の相互作用を介して示唆するものであり、

これら患者に見られる肺疾患の発生に関与している。そのためこれらのマウスは間質性肺炎のモデルマウスとして有用である。

炎症性腸炎（クローン病及び潰瘍性大腸炎）患者の大腸及び空腸におけるOX40/OX40Lの発現はすでに知られている。Higginsらは、
5 OX40LをOX40-IgG融合蛋白質で阻害すると、ハプテン誘導性大腸炎の症状あるいは特発性大腸炎を患ったIL-2ノックアウトマウスの症状が改善することを示した。ハプテン誘導性大腸炎は、ヒト炎症性大腸炎のモデルとしてよく使用される。大腸炎の誘導についてのハプテンの直接的影響を否定することはできないが、このモデルではヒト
10 の炎症性腸炎の病原を示すのは不可能である。

IL-2^{-/-}マウス、IL-2R α ^{-/-}マウス、IL-10^{-/-}マウス、TGF β 1^{-/-}マウス、TCR α ^{-/-}マウス、G α i2^{-/-}マウス、ヒトCD3 ϵ 遺伝子に対してトランスジェニックであるT細胞再構築tg ϵ 26マウス、IL-7TgマウスC. B-17scidマウスなど
15 その他のモデルマウスには、炎症性腸炎が発生する（Sadlack B. et al., 1993, Cell, 75, 253; Kuhn R. et al., 1993, Cell, 75, 263; Mombaerts P et al., 1993, Cell, 75, 275; Rudolph U et al., 1995, Nat. Genet. 10, 143; Hollander GA et al., 1995, Immunity, 3, 27; Watanabe et al., 1998, J. Exp. Med., 187, 389; Sundberg JP., 1994, Gastroenterology, 107, 1726;
20 Powrie F et al., 1993, Int. Immunol., 5, 1461）。炎症性腸炎は免疫制御の不良による結果であり、かかる疾患は主にCD4⁺T細胞の活性化により仲介される。マウスの自然発症性大腸炎の発生にCD4⁺T細胞が重要な役割を果たすことが、本発明者らが今回得た結果によって確認されている。OX40L-Tgマウスにおける炎症性腸炎の自発的発生に
25 よって、OX40/OX40L相互作用が炎症性腸炎の病因に関与している可能性が明らかになり、胃腸管疾患の免疫療法における実現可能な

目標がもたらされることとなった。

Tgマウスに見られる自己免疫の基礎的機構と考えられるものは、ア
ゴニストのOX40抗体がT細胞の寛容を破壊できると示した近年の研
究によって説明がつくだろうが、サイトカインの役割は、未だに解明さ
5 れていない。自然発症性肺炎や腸炎を患ったOX40L-Tgマウスは、
血清中のTh-2サイトカイン、IL-5及びIL-13のレベルが上
昇していた(図5C)。OX40L-Tgマウス由来のCD4⁺T細胞を
再構築したRag-2欠損マウスにも、同様のサイトカインの上昇が認
められた。OX40L-TgマウスはTh-2ドミナントであることが
10 わかった。Th-1/Th-2サイトカインの間質性肺炎の発生への関
与が示唆されている。IL-4トランスジェニックマウス及びIL-1
3トランスジェニックマウスは、肺の単核細胞、気道上皮の肥厚、粘液
分泌過多及び杯状細胞の過形成を特徴とする炎症性の反応を引き起こす
(Zhu et al., 1999, J. Clin. Inv. 103, 779)。気管支肺胞洗浄液中のIL
15 - 5は、肺炎患者において高いレベルを示した(Taniguchi et al., 2000,
Eur. Respir. J., 16, 959)。IL-13及びIL-5マウスの高い産生は、
OX40L-Tgマウスの間質性肺炎の発生に直接関与している場合が
ある。CD4 Tg Tリンパ球をRag-2欠損マウスに移入することによ
り、リンパ球性間質性肺炎及び大腸の炎症性腸炎を誘導することが可
20 能になり、これがCD4⁺T細胞依存物質に仲介された疾患であることを
示している。

近年、OX40はT細胞を活性化できる主要な共刺激分子として強調
されている。OX40欠損マウスあるいはOX40L欠損マウスは、イ
ンビボでの強いCD4⁺T細胞反応をサポートできなかった(Chen et
25 al., 1999, Immunity, 11, 689; Pippig et al., 1999, J. Immunol., 163, 652;
Murata et al., 2000, J. Exp. Med., 191, 365)。また、OX40L欠損マウ

スに抗原を与えたところ、抗原提示細胞機能が欠失しているのが認められた (Murata et al., 2000, J.Exp.Med., 191, 365)。これらのデータから、インビボにおける T-A P C 相互作用に O X 4 0 / O X 4 0 L 相互作用が不可欠であることがわかった。本発明者らは、T細胞上に O X 4 0 L の構成性発現を示すマウスを作製して O X 4 0 を恒常的に刺激し、最終的には器官特異的自己免疫疾患となる一連の事象に至る、T細胞の記憶発生における O X 4 0 L のさらなる重要性を明らかにした。

(方法 1 O X 4 0 L - T g マウスの作製)

T細胞系特異的ベクター p 1 0 1 7 (l c k プロモーターにヒト成長ホルモン遺伝子由来のポリ A シグナルが組み込まれたベクター; Perlmutter から供与された) に、マウス O X 4 0 リガンドをコードする c D N A を導入した。かかる導入遺伝子を F 1 受精卵 (C 5 7 B L / 6 × D B A / 2) の前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親のマウスの輸卵管に移植することによって仔マウスを産生させた。得られた仔マウスの中から、上記導入遺伝子を有する初代マウスを P C R により同定し、さらなる実験のため、かかる初代マウスを C 5 7 B L / 6 系統マウスと少なくとも 1 2 回戻し交配した。なお、マウス受精卵の注入に先立ち、マウスの培養細胞に上記遺伝子を導入することにより能力を確認した。エレクトロポレーション法を用いてかかる導入遺伝子を T細胞系に導入したところ、高いレベルの表面 O X 4 0 リガンド蛋白質が検出された。

(方法 2 F A C S 分析)

F c レセプターに結合するものを含む細胞群の中から、標識モノクローナル抗体に非特異的に会合する細胞を取り除くために正常ラット血清を用いてプレインキュベーションした後、標識モノクローナル抗体を用いて 4 ° C で 3 0 分間インキュベーションした。インキュベーション後、

試料を洗浄して FACSCalibur フローサイトメーター (Becton Dickinson 社製) で分析した。分析には、CELLquest (Becton Dickinson 社製) 分析ソフトウェアを使用した。CD 3、CD 8、CD 4、CD 5、CD 2 5、CD 6 9、B 2 2 0、I g M、CD 4 4、CD 4 5 R B、I L - 2、
5 I L - 4、及び I F N γ は、Pharmingen 社から購入した。上記により確立された細胞におけるマウス O X 4 0 L に特異的な M G P 3 4 (I g G 2 c)、及びマウス O X 4 0 に特異的な M O X 4 0 (I g G 1) を、NH S - L C - ピオチン (Pierce Chemical Co. 社製) と結合させた。ピオチン化モノクローナル抗体で標識した細胞をストレプトアビジン - A P C
10 (Pharmingen 社製) で視覚化し、フローサイトメトリー分析にかけた。O X 4 0 L 又は O X 4 0 のネガティブコントロールに対しては、標識されていない M G P 3 4 及び M O X 4 0 をそれぞれ用いて上記細胞をプレインキュベーションし、ピオチン化抗体により特異的に染色したものを無効にした。

15 細胞内サイトカイン染色のため、脾臓あるいはリンパ節細胞の単細胞懸濁液を 5 0 n g / m l の P M A (Sigma 社製) 及び 1 μ M のイオノマイシン (Sigma 社製) で 2 時間刺激した後、Gorgi Stop (Pharmingen 社製) を添加してさらに 2 時間培養した。刺激後、細胞を A P C 標識 C D 4 又は C D 8 で染色し、続いてかかる細胞を固定し、Cytotfix/Cytoperm
20 kit (Pharmingen 社製) で浸透処理した後、製造者のプロトコールに従って P E 標識抗 I L - 2 抗体、抗 I L - 4 抗体あるいは抗 I F N - γ 抗体を用いて、製造者が推奨する方法で染色した。

(方法 3 細胞の精製及び培養)

25 磁気ビーズで濃縮した、又は Auto MACS (Miltenyi Biotec 社製) で分別した脾臓細胞若しくはリンパ節細胞から、C D 4 ⁺ T 細胞あるいは C D 8 ⁺ T 細胞を濃縮した。6 週齢の野生型マウス又は O X 4 0 L - T g

マウスから得られたT細胞 (1×10^5) を培地のみで、又はT細胞を増殖させるために、ConA ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)、イオノマイシン ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) を添加したPMA ($10 \text{ ng}/\text{ml}$)、又は固定化抗CD3モノクローナル抗体 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した培地にてそれぞれ48
5 時間培養し、各 ^3H チミジンの摂取量を分析した。

(方法4 インビボにおける蛋白質抗原刺激によるT細胞のプライミング反応及びリコール反応)

OX40Lトランスジェニックマウス又は同腹子の野生型マウスに対して、 $100 \mu\text{g}$ のKLHを完全フロイントアジュバントとともに、それぞれの後肢の肉趾に注射して免疫した。9日後、リンパ節細胞を図に記載の濃度のKLHとともに 37°C で3日間インキュベーションした。一方、リンパ節から精製した $\text{CD}4^+$ T細胞を、KLHを用いてAPCの存在下で同様に刺激した。かかるAPCは、野生型同腹子の脾臓から単離し、放射線 ($3,000 \text{ rad}$) で処理したものを用いた。上記培
10 養した細胞を、文献 (Takeshita et al., 1989, J.Exp.Med., 169, 1323; Nagata et al., 1999, J.Immunol., 162, 1278) 記載の方法と同様に、インビトロでKLHに対する反応における ^3H チミジンの取り込みやサイトカイン産生について分析した。サイトカイン産生においては、2度目のKLHの添加から、IL-2又はIL-4に関しては48時間後に、IL-5、IL-10又はIFN γ に関しては96時間後に培養液の上澄
20 を回収した。かかる上澄をELISAにそれぞれかけ、サイトカイン産生を測定した。

(方法5 ELISA)

組織培養の上澄液又はマウス血清中のサイトカインレベルを、製造者のプロトコールに基づき、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、又はIFN γ (Pharmingen 社製) に対する抗体を用いて、
25

E L I S Aにより分析した。

(方法6 免疫グロブリンの分泌)

マウス血清中の各種免疫グロブリンサブクラスのレベルを分析した。

- 10 μg/mlのヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体を含んだ炭酸緩衝液
5 で、E L I S Aマイクロプレートの各ウェルを4℃で1晩インキュベ
ーションすることによりコートした。プレートを洗浄した後、1%のB S
Aを含むP B Sでヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体を37℃で1時間ブ
ロックした。1%のB S Aを含むP B Sで希釈した、O X 4 0 L - T g
マウス由来又は野生型マウス由来の血清をウェルに添加し、室温で2時
10 間インキュベーションした。その後プレートを洗浄した後、インキュベ
ーションにより検出された抗体を、アルカリフォスファターゼ (A P)
(Southern Biotechnology Associates 社製) が結合したヤギ抗マウス
I g M抗体、I g G 1抗体、I g G 2 a抗体、I g G 2 b抗体、I g G
3抗体、又はI g A抗体と結合させ、1時間インキュベーションした。
15 インキュベーション後、A P基質-(Sigma Chemical社製)-を含むジエタ
ノールアミン緩衝液を用いて染色し、3 MのN a O Hにより反応を停止
させて、かかる溶液をO D 4 0 5 n mで評価した。

(方法7 組織学的及び免疫組織化学的分析)

- 動物から得られた組織を10%の緩衝ホルマリン (Sigma 社製) で固
20 定し、パラフィン包埋し、常法により、5マイクロメートル切片をヘマ
トキシリン及びエオシンで染色した。かかる組織サンプルを、O C Tコ
ンパウンドで包埋して凍結し、又は液体窒素により凍結し、-80℃で
保管した。その後、製造者のプロトコールに従って、抗マウスC D 4抗
体 (H129.19、Becton Dickinson 社製) 及び抗マウスC D 8抗体 (53-
25 6.7、Becton Dickinson 社製) ならびにF I T C標識抗ラットI g G抗
体 (生化学工業社製) を用いて免疫組織化学染色を行った。

産業上の利用可能性

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、OX40リガンドをT細胞で恒常的に発現し、自己免疫疾患を発症するので、自己免疫疾患
5 モデルとして有用である。該トランスジェニック非ヒト哺乳動物は、自己免疫疾患治療薬のスクリーニングに有効に利用することができる。

請 求 の 範 囲

1. O X 4 0 L 遺伝子が導入され、O X 4 0 L を T 細胞で恒常的に発現していることを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
- 5 2. O X 4 0 L 遺伝子が、G e n B a n k 登録番号 U 1 2 7 6 3 の D N A 配列からなることを特徴とする請求項 1 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
3. O X 4 0 L 遺伝子が、T 細胞特異的 l c k プロモーター制御下に導入されていることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
- 10 4. O X 4 0 L 遺伝子が導入され、自己免疫疾患を発症していることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
5. 自己免疫疾患が、間質性肺炎であることを特徴とする請求項 4 記載
- 15 のトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
6. 自己免疫疾患が、炎症性腸炎であることを特徴とする請求項 4 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
7. 炎症性腸炎が、腸基底膜における中程度から重度のリンパ系組織の過形成、基底膜における粘膜上皮の過形成、リンパ球の浸潤又は粘膜下
- 20 リンパ濾胞の増生を発症していることを特徴とする請求項 6 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
8. 自己免疫疾患が、巨脾症又はリンパ腺症であることを特徴とする請求項 4 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
9. 自己免疫疾患が、高免疫グロブリン血症であることを特徴とする請求項 4 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物。
- 25 10. トランスジェニック非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴

とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

1 1 . O X 4 0 L をコードする発現プラスミド DNA を、非ヒト哺乳動物の受精卵の前核にインジェクションすることにより、O X 4 0 L 遺伝子
5 子を非ヒト哺乳動物に導入することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。

1 2 . O X 4 0 L 遺伝子が、G e n B a n k 登録番号 U 1 2 7 6 3 の DNA 配列からなることを特徴とする請求項 1 1 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。

1 0 1 3 . O X 4 0 L をコードする発現プラスミド DNA が、T 細胞特異的 l c k プロモーター制御下の O X 4 0 L c DNA で構成されていることを特徴とする請求項 1 1 又は 1 2 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。

1 4 . O X 4 0 L 遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物
1 5 を、戻し交配により純化したことを特徴とする請求項 1 1 ～ 1 3 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。

1 5 . 戻し交配を、少なくとも 1 2 世代行うことを特徴とする請求項 1 4 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。

1 6 . 非ヒト哺乳動物が、マウスであることを特徴とする請求項 1 1 ～
2 0 1 5 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。

1 7 . O X 4 0 L 遺伝子を l c k プロモーターの下流に組み込んだ O X 4 0 L 発現ベクターを、マウスの受精卵に導入し、該マウスを C 5 7 B L / 6 系マウスに戻し交配したことを特徴とする請求項 1 6 記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法。

2 5 1 8 . 請求項 1 ～ 9 のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を用いることを特徴とする自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法。

19. 自己免疫疾患が、間質性肺炎、炎症性腸炎、巨脾症若しくはリンパ腺症、又は高免疫グロブリン血症であることを特徴とする請求項18記載の自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法。

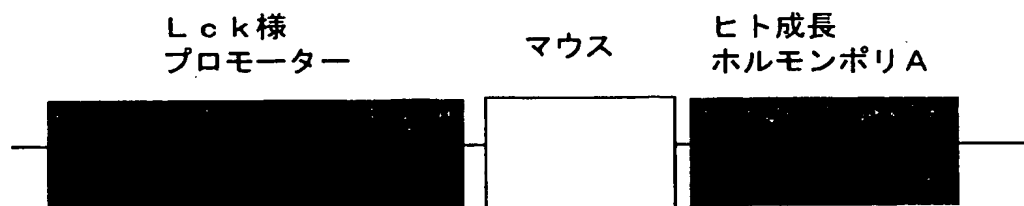
20. 請求項1～9のいずれか記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に被検物質を投与し、自己免疫疾患の病徴の変化を評価・測定することを特徴とする請求項17又は18記載の自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法。

21. トランスジェニック非ヒト哺乳動物がマウスであることを特徴とする請求項18～20のいずれか記載の自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法。

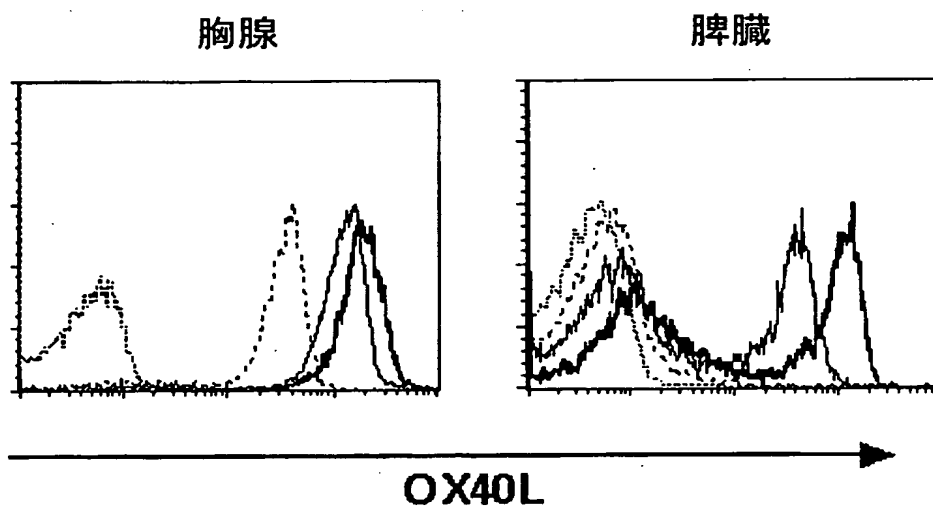
22. 請求項18～21のいずれか記載の自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法により得られた糖尿病治療薬。

第 1 図

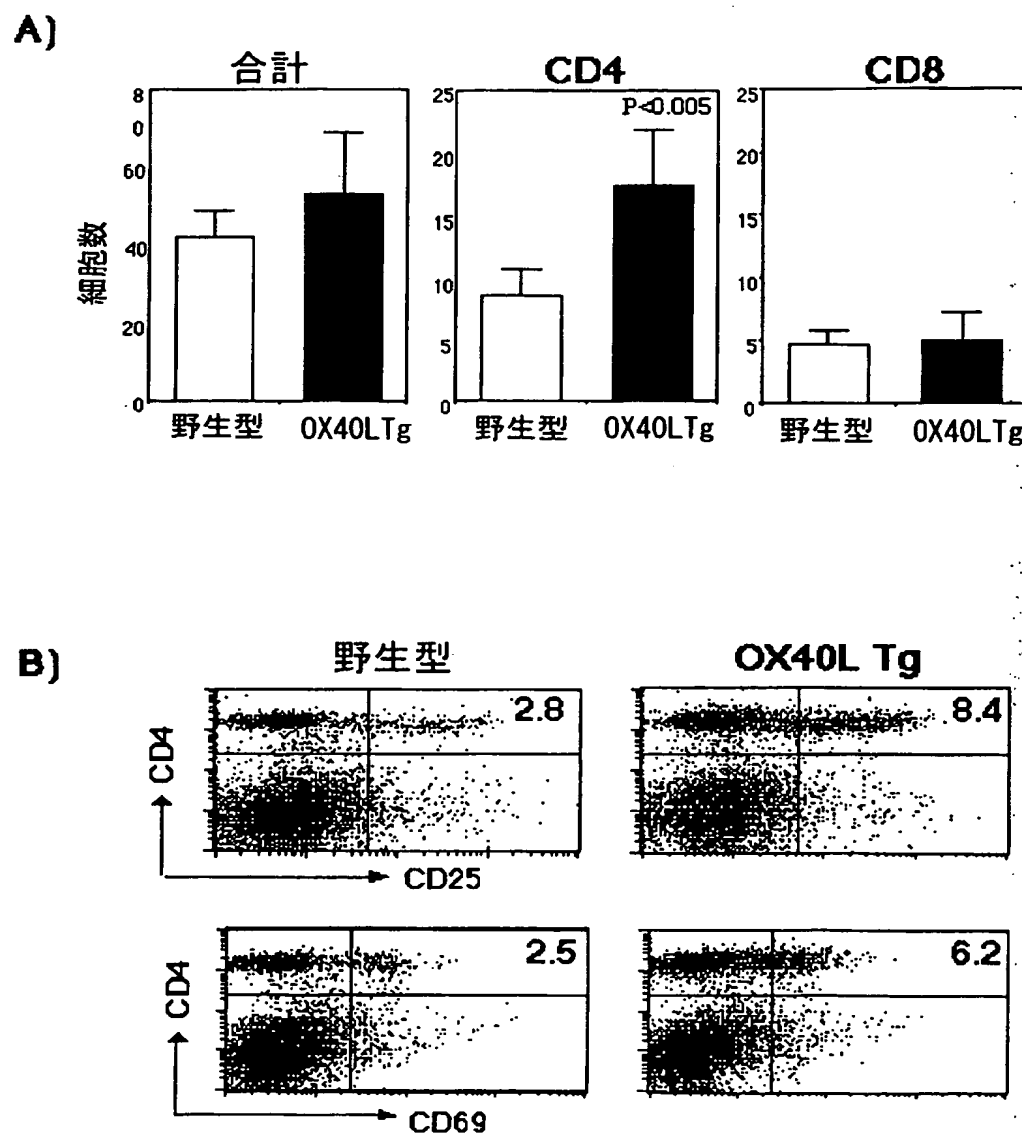
(A)



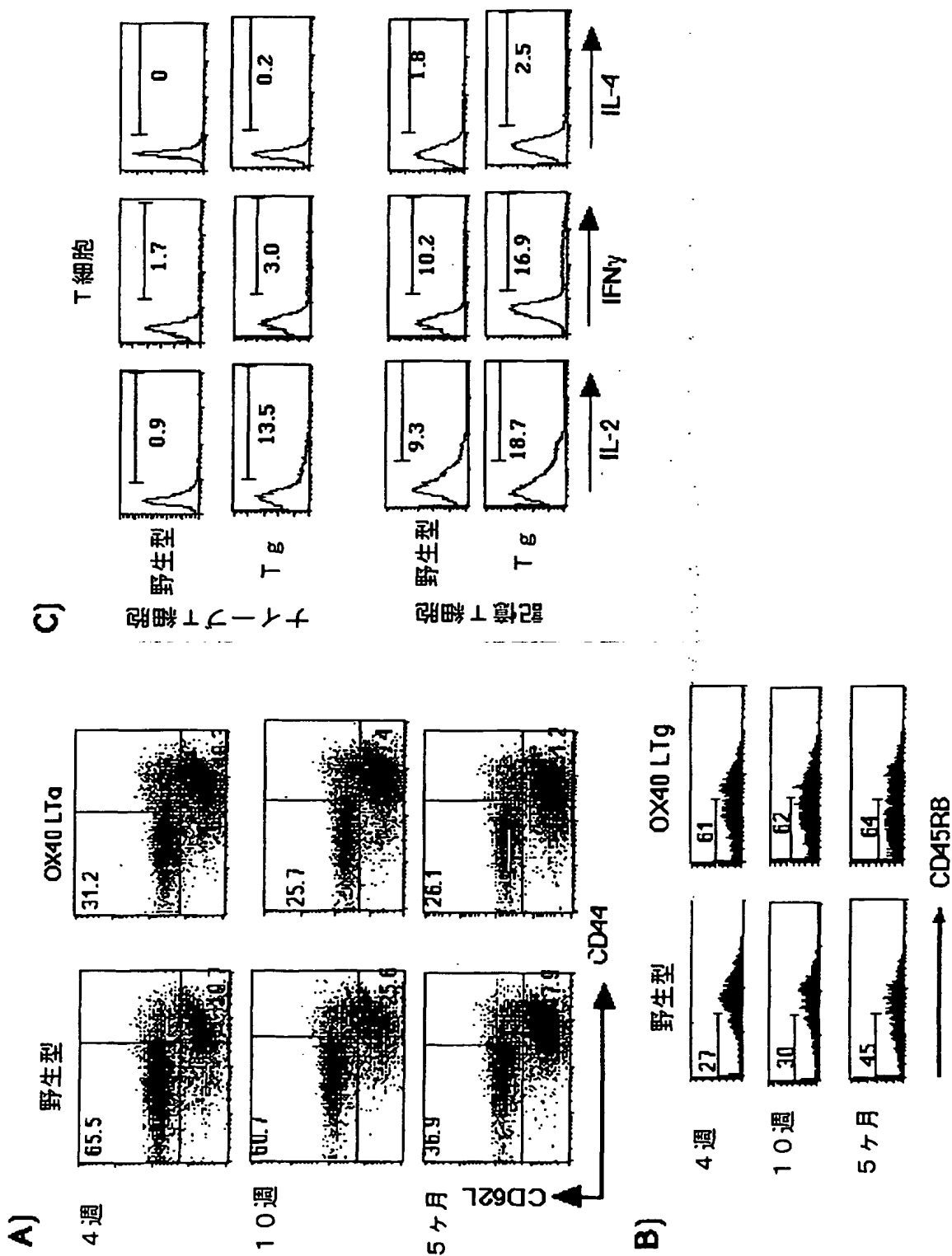
(B)



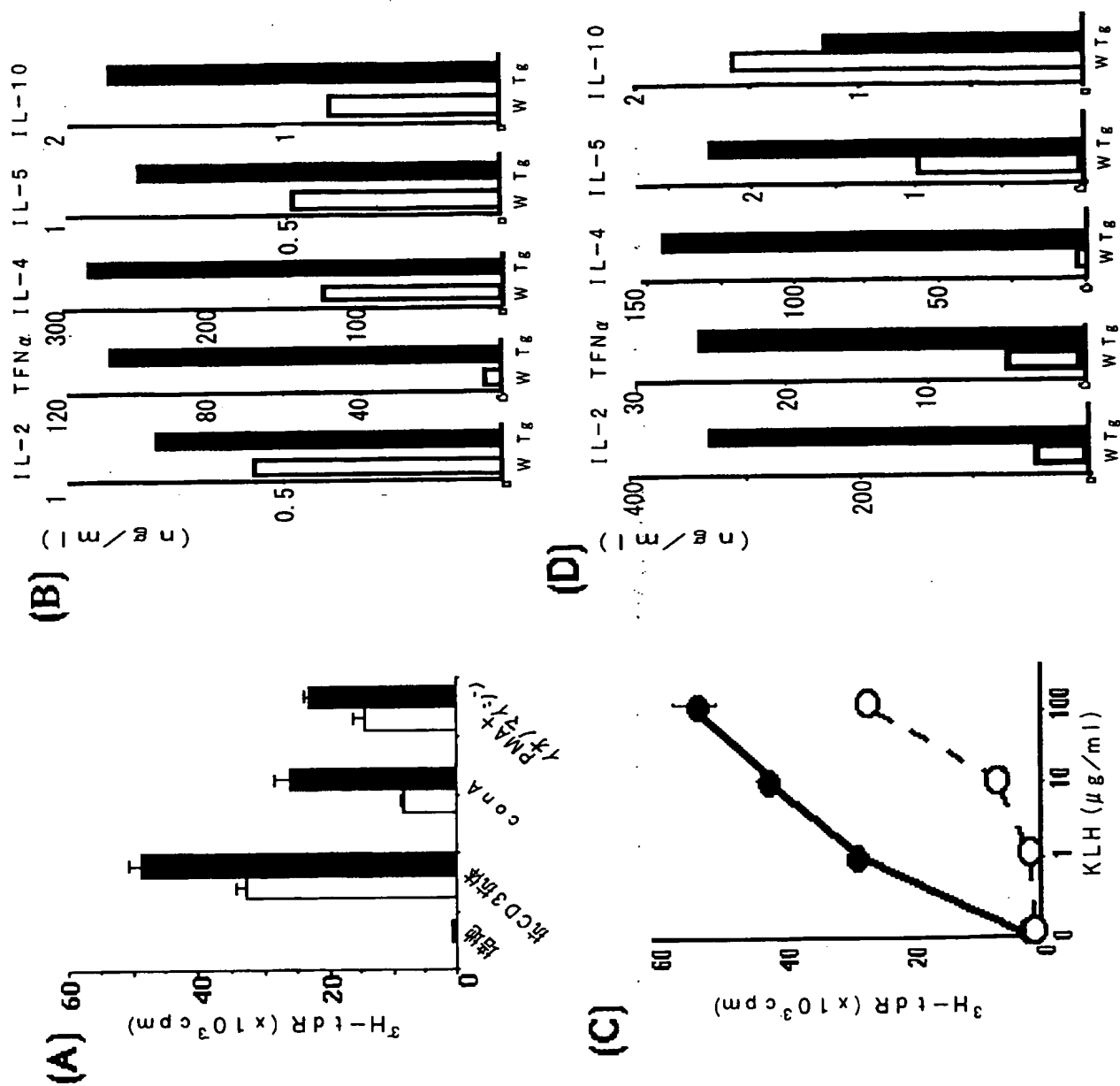
第 2 図



第 3 図

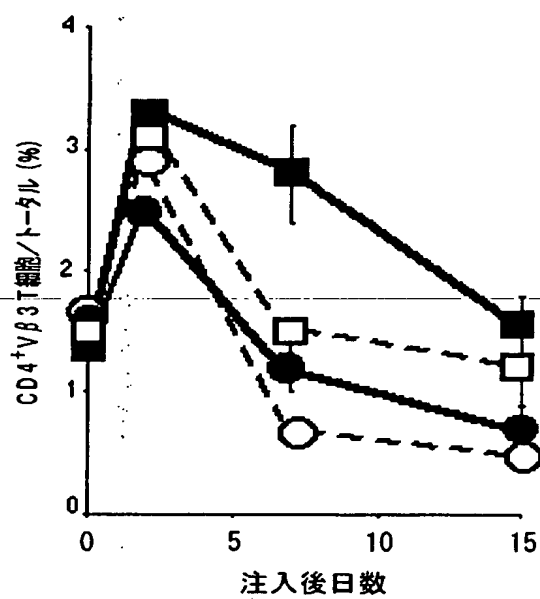


第 4 図

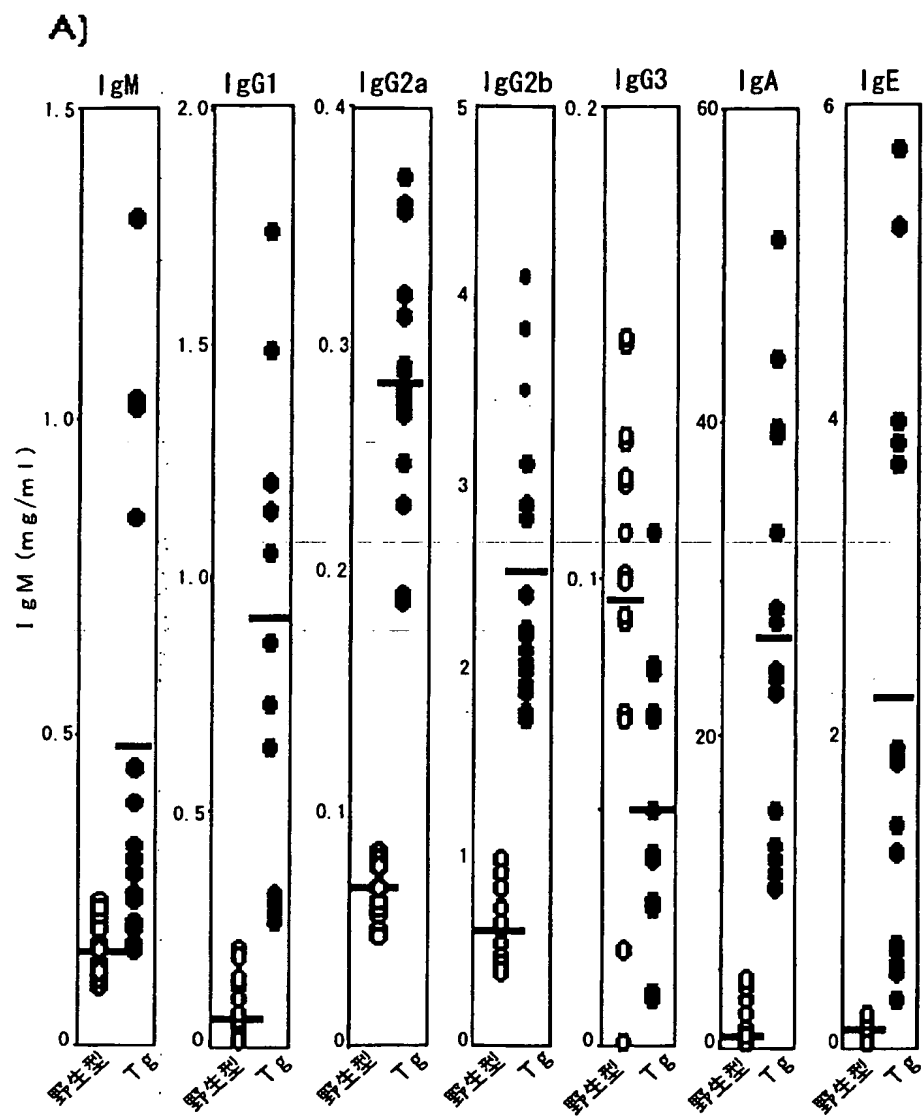


第 4 図
(前頁の続き)

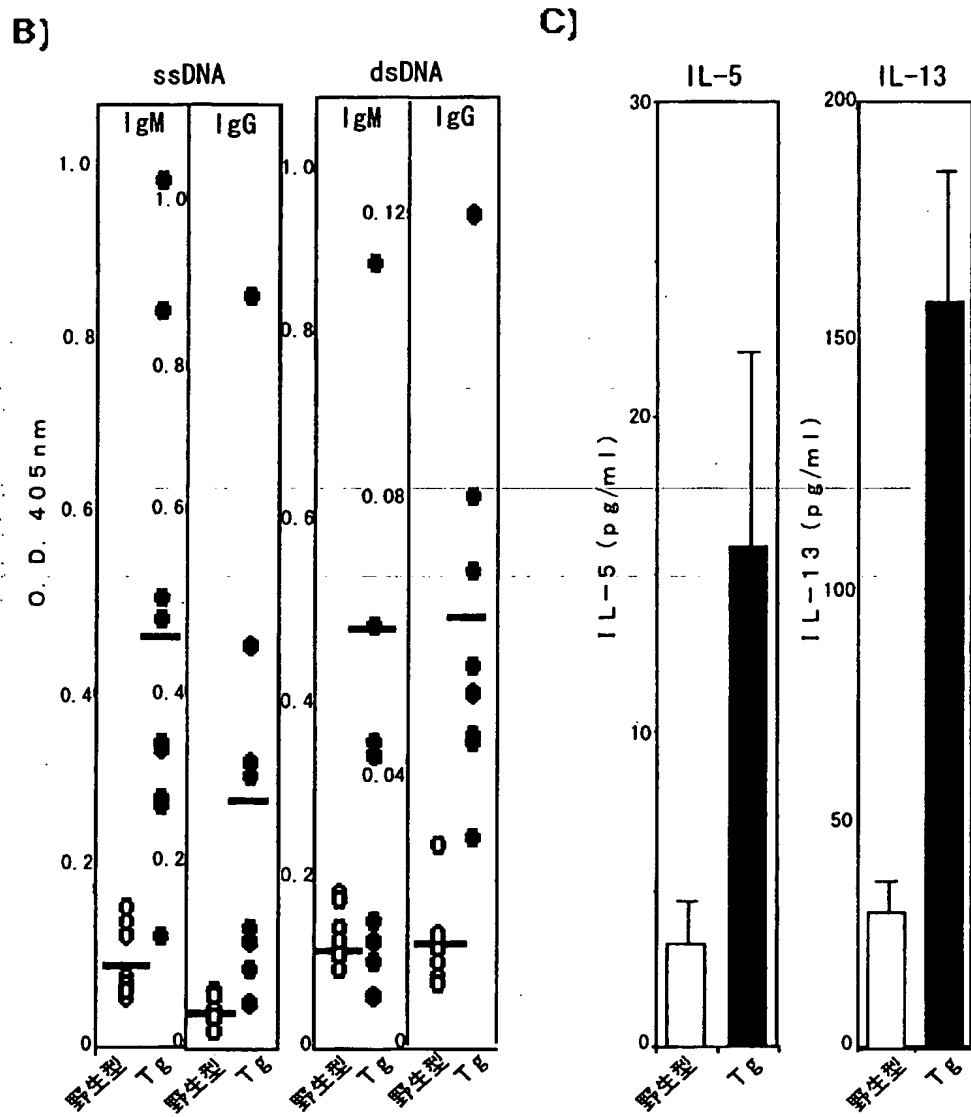
(E)



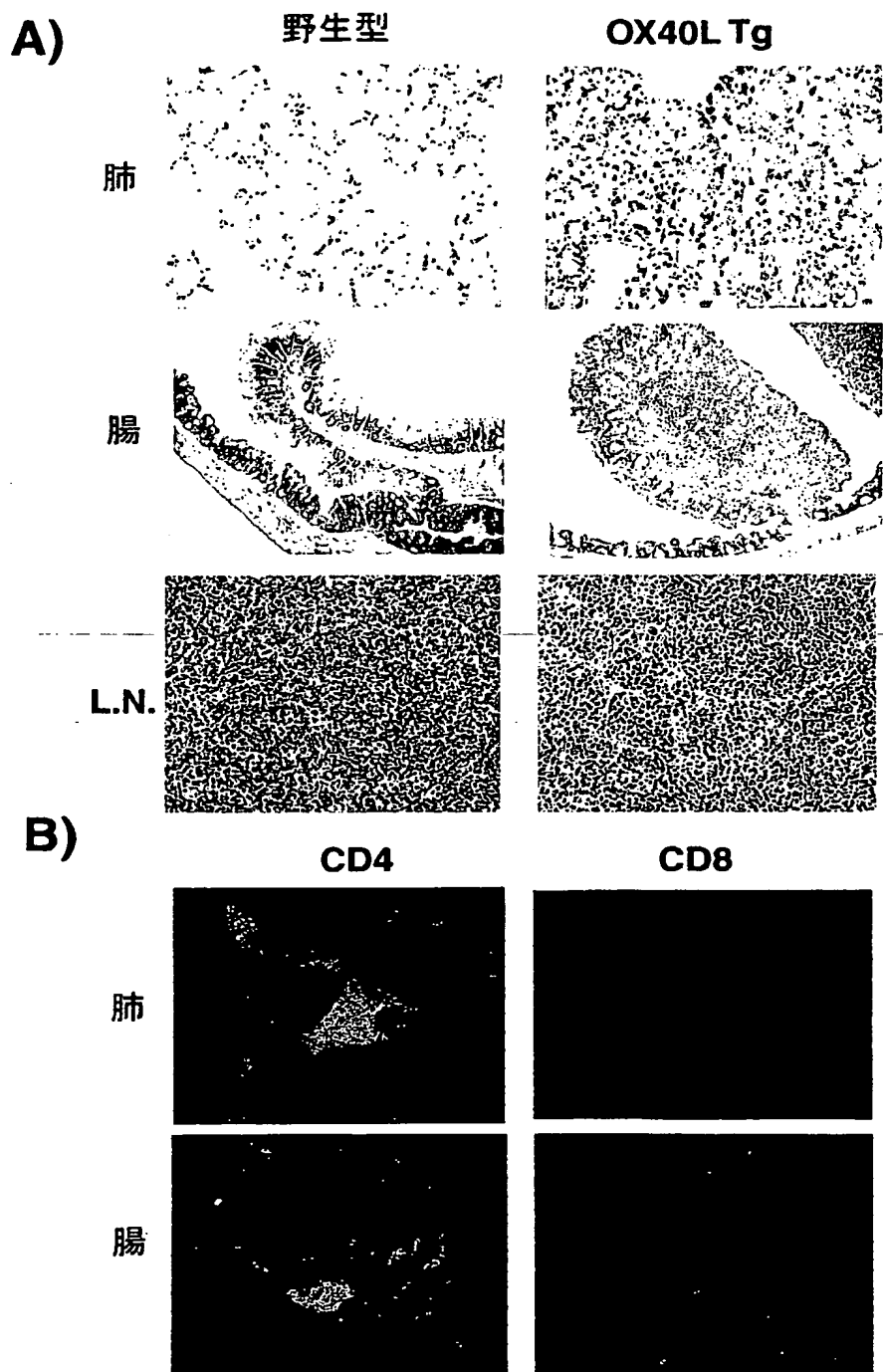
第 5 図



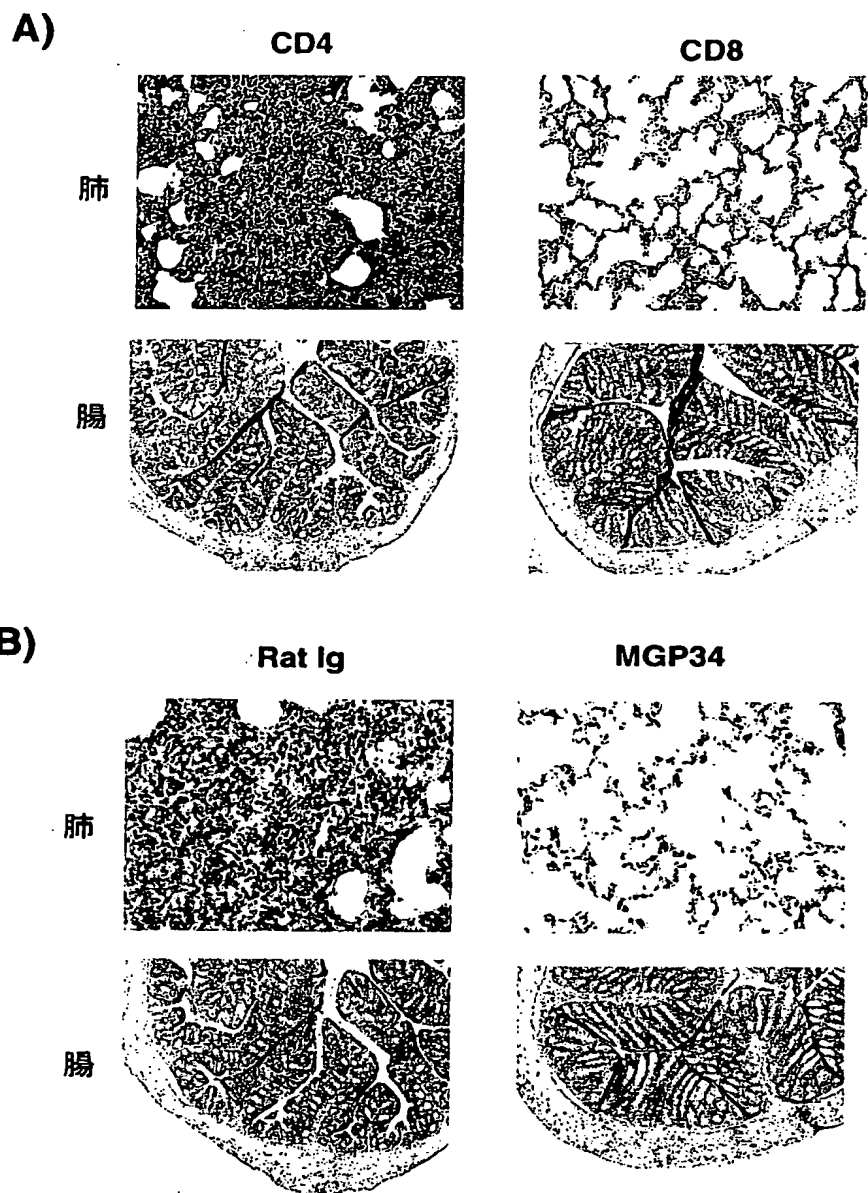
第 5 図
(前頁の続き)



第 6 図



第 7 図



特許協力条約に基づく国際出願願書

A031-39PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2002年07月29日（29.07.2002）月曜日 10時22分07秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、 科学技術振興事業団は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のよう に開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付：	2001年08月01日（01.08.2001）
VIII-5-1 (iii)	開示の名称：	第55回日本細菌学会東北支部総会講演要旨集
VIII-5-1 (iv)	開示の場所：	23頁
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のため になされたものである。：	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07674

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K67/027, G01N33/15, G01N33/50, A61K45/00, A61P3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS(STN), BIOTECHNO(STN), CANCERLIT(STN), CAPLUS(STN), EMBASE(STN),
ESBIOBASE(STN), FEDRIP(STN), LIFESCI(STN), MEDLINE(STN),
SCISEARCH(STN), TOXCENTER(STN), OX40L, TRANSGEN?

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kazuko MURATA et al., "OX40 Ligand Transgenic Mouse no Kaiseiki", Dai 55 Kai Japanese Society for Bacteriology Tohoku Sibuo Sokai Koen Yoshishu, Japanese Society for Bacteriology Tohoku Shibuo, 01 August, 2001 (01.08.01), page 23	1-21
X Y	Ndhlovu L.C. et al., Critical Involvement of OX40 Ligand Signals in the T Cell Priming Events During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis., J.Immunol., 01 September, 2001 (01.09.01), Vol.167, No.5, pages 2991 to 2999	1-18, 20, 21 19
X Y	Ndhlovu L.C. et al., OX40 Ligand Signals Are Critical for The T-Cell Priming Events during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis., FASEB J., 07 March, 2001 (07.03.01), Vol.15, No.4, page A344, 275.16	1-18, 20, 21 19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
10 October, 2002 (10.10.02)Date of mailing of the international search report
29 October, 2002 (29.10.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

International application No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07674

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 22
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Concerning the "remedy for diabetes", no specific drug is disclosed in the description. Thus, the invention as set forth in claim 22 is not sufficiently supported by the description.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01K67/027, G01N33/15, G01N33/50, A61K45/00,
A61P3/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(STN), BIOTECHNO(STN), CANCERLIT(STN), CAPLUS(STN), EMBASE(STN), ESBIODBASE(STN), FEDRIP(STN), LIFES
CI(STN), MEDLINE(STN), SCISEARCH(STN), TOXCENTER(STN)
OX40L, TRANSGEN?

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	村田和子、外5名、OX40リガンドトランスジェニックマウスの解 析、第55回日本細菌学会東北支部総会講演要旨集、日本細菌学会 東北支部、2001.08.01、P.23	1-21
X Y	Ndhlovu L.C., et al., Critical Involvement of OX40 Ligand Signals in the T Cell Priming Events During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis., J. Immunol., 2001.09.01, Vol.167, No.5, p.2991-2999	1-18, 20, 21 19
X	Ndhlovu L.C., et al., OX40 Ligand Signals Are Critical for	1-18, 20, 21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.10.02

国際調査報告の発送日

29.10.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉田 佳代子

2B

9516

電話番号 03-3581-1101 内線 6493

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 22 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
「糖尿病治療薬」について、明細書中に何ら具体的な開示がされていないので、請求の範囲22に記載された発明は、明細書により十分に裏付けられていない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。